

Eesti koolinoorte 58. bioloogiaolümpiaad

Molekulaarbioloogia praktikum



Eesnimi:.....

Perekonnanimi:.....

Töö kood:.....

Juhendajad: Mari Tagel, Kristina Põšnograjeva, Karl Jürgenstein

Algavas töös on 2 praktilist ülesannet ning neil põhinevad küsimused. Tungivalt soovituslik on alustada **kohe** praktiliste ülesannetega. Töö käigus tekib pause, mille ajal on võimalik tutvuda teooriaga ning vastata küsimustele.

Kontrolli mõlema praktilise töö juures, kas Sinu on laual olemas kõik töövahendid, mis on tööks vajalikud. Kui Sinu laual on midagi puudu, siis anna sellest kohe assistendile märku.

Kloneerimisülesande puhul peab DNA proov jõudma assistendi kätte **vähemalt 50 minutit** enne praktikumi lõppu.

Arvutusülesannetes on vajalik näidata nii arvutuskäik kui ka lõppvastus!

Üldised vahendid:

- 2-20 µl automaatpipett
- 10-100 või 20-200 µl automaatpipett
- 100-1000 µl automaatpipett
- Kollased pipetiotsikud
- Sinised pipetiotsikud
- Stopper

Automaatpipeti kasutamise õpetus

Automaatpipetiga saab täpselt pipeteerida enda valitud mahtu vedelikku. Igal automaatpipetil on peal mahuvahemik, milles seda reguleerida saab. Vahemik on antud mikrolitrites. Mahtu reguleeritakse pipeti ülemise nupu otsas olevat ratast keerates. Valitud maht on näha aknakeses. Erineva värviga on tähistatud kas mikrolitri komakoht (kõige alumine number) või milliliiter (kõige ülemine number). Näiteks: „100“ = 100 µl, kuid kui esimene number on teist värvi, siis „100“ = 1000 µl = 1 ml. Samamoodi „100“ = 10,0 µl. Pipettidele on alati peale märgitud ruumalavahemik, mida sellega on võimalik pipeteerida. **Ole hoolas ja ära kunagi keera pipetti selle mõõtevahemikust välja! Võid pipeti rikkuda!**

Pipetti kasutatakse alati koos vastava pipetiotsikuga: kuni 1 ml võimaldavale pipetile sinised, väiksematele kollased. Otsiku võtmiseks suru pipett lihtsalt otse karbis oleva otsiku külge. Pärast pipeteerimist vajuta pipetinupu juures olevale klahvile, et otsik prüginousse lasta. Ära otsikut käega puutu!

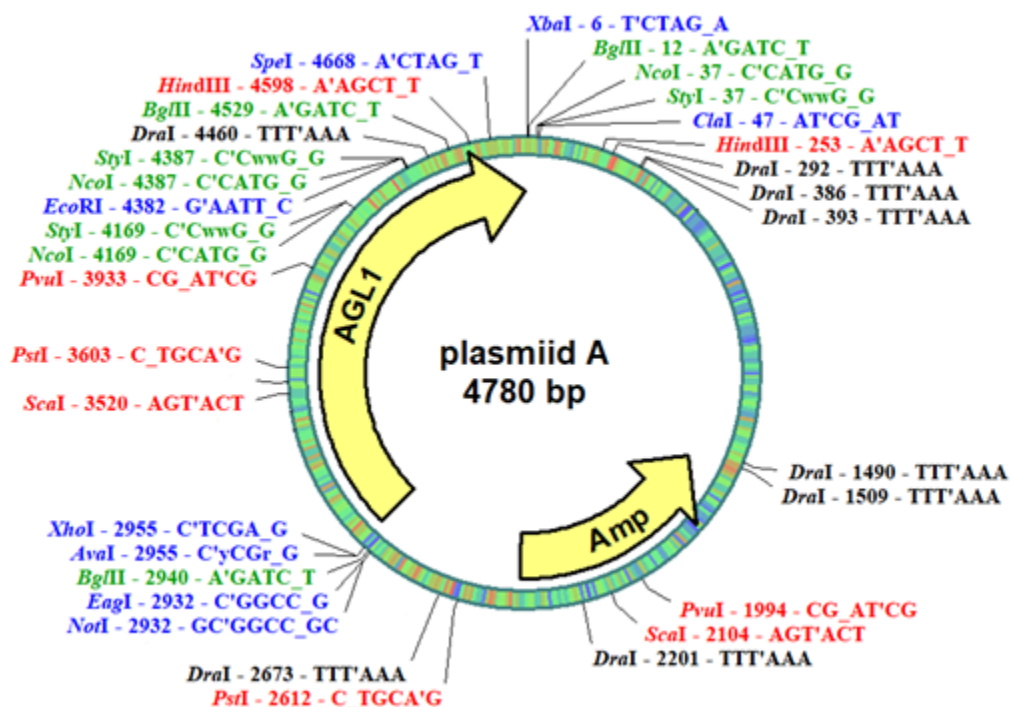
Laboriassistendid jälgivad selle punkti täitmist eriti rangelt! Ilma otsikuta reostad pipeti!

Otsik on ühekordseks kasutamiseks, eriti kui kasutad seda mingi alglahuse võtmiseks. Kui näiteks tõstad ühe otsikuga bakterikultuuri ja seejärel sama otsikuga teist bakterikultuuri tõstad, saastad sa oma teise kultuuri ja su edasise töö täpsus kannatab.

Pipeteerimiseks kasuta nuppu pipeti otsas. Nupp liigub alla kahes järgus: esmalt kuni mõõdupunktini ja siis juba raskemalt edasi tühjendamispunktini. Valitud ruumala sisse võtmiseks vajuta nupp kõigepealt mõõdupunktini alla, pane otsik vedelikku ja lase nupp sujuvalt üles. Vedeliku välja laskmiseks teise tuubi vajuta nupp sujuvalt täiesti alla. Mõõdupunktist üle vajutamine tühjendab otsiku täielikult. **Kui oled vedeliku pipetiotsikusse võtnud, on keelatud pipetti tagurpidi keerata!**

1. Kloneerimise ülesanne

Katrin tahab uurida ühe pärmi, *Scheffersomyces stipitise* ensüümi α -glükosidaasi, mida kodeerib geen nimega AGL1. Geen AGL1 on pärmi *Scheffersomyces stipitis* genoomist kloneeritud plasmidi A. Plasmidi A saab kasutada valgu AGL1 tootmiseks bakteris *Escherichia coli*. Katrini katsed on aga näidanud, et bakteris toodetud α -glükosidaas ei saavuta õiget tertsiaalset struktuuri ning seega ei ole ensüüm aktiivne. Katrin tuleb mõttele ensüümi toota hoopis pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*). Selleks tuleb valku kodeeriv geen AGL1 kloneerida teise plasmidi. Esimene samm (sinu poolt tehtav praktiline osa) on lõigata geen AGL1 välja plasmidist A, kasutades restriктаase XbaI ja XhoI.



Joonis 1. Plasmidi A kaart. Kollaste nooltega on tähistatud geenid, noole suund näitab transkriptsiooni suunda. Keskel on välja toodud plasmidi kogupikkus (bp=*basepair* e aluspaar). Plasmidi skeemi juures on näidatud restriктаasid, mis plasmidi lõikavad. Restriктаasi nime juurde on välja toodud üks ahel nukleotiidsest järjestusest, mille restriктаas ära tunneb ning ülakomaga on märgitud ära katkestuse täpne koht äratundmisjärjestuses matriitsahelal ja alakriipsuga on tähistatud katkestuse asukoht komplementaarsel ahelal.

Töövahendid:

- Bakterist eraldatud DNA lahus
- 10-kordne restriksioonipuhver (10x)

- Vesi (H₂O)
- Restriktaasid XbaI ja XhoI (jäätopsis ees laual)
- Tühi reaktsioonituub

Töö käik:

DNA lõikamiseks tuleb segada kokku restriksioonisegu. Selleks pipeteeri reaktsioonituubi:

- 10 µl vett
- 4 µl DNA lahust,
- 2 µl 10x puhvrit ja
- 2 µl restriktaasi XbaI
- 2 µl restriktaasi XhoI

NB! Restriktaasid lisa viimasena!

Reaktsiooni läbiviimiseks too oma segu kõigepealt 15 minutiks 37 °C termostaati ning tõsta seejärel 5 minutiks 80 °C termostaati, aega saad stopperiga jälgida. Järgnevalt too oma töö koodiga proov laboriassistendile hiljemalt 50 minutit enne praktikumi lõppu! Hilisemaid proove ei arvestata! Assistentid lahutavad kõik proovid elektrofooresil ning toovad Teile proovide pildid hiljemalt 20 minutit enne praktikumi lõppu tagasi.

1.1. Arvuta, kui pikad DNA lõigud tekivad plasmidi A lõikamisel restriktaasidega XbaI ja XhoI!

(1p)

Ühe lõigu pikkuse arvutamiseks tuleb lahutada restriktaasi XhoI lõikekoha positsioonist XbaI oma. Lõikekohtade positsioonid on leitavad joonisel 1

2955-6=2949

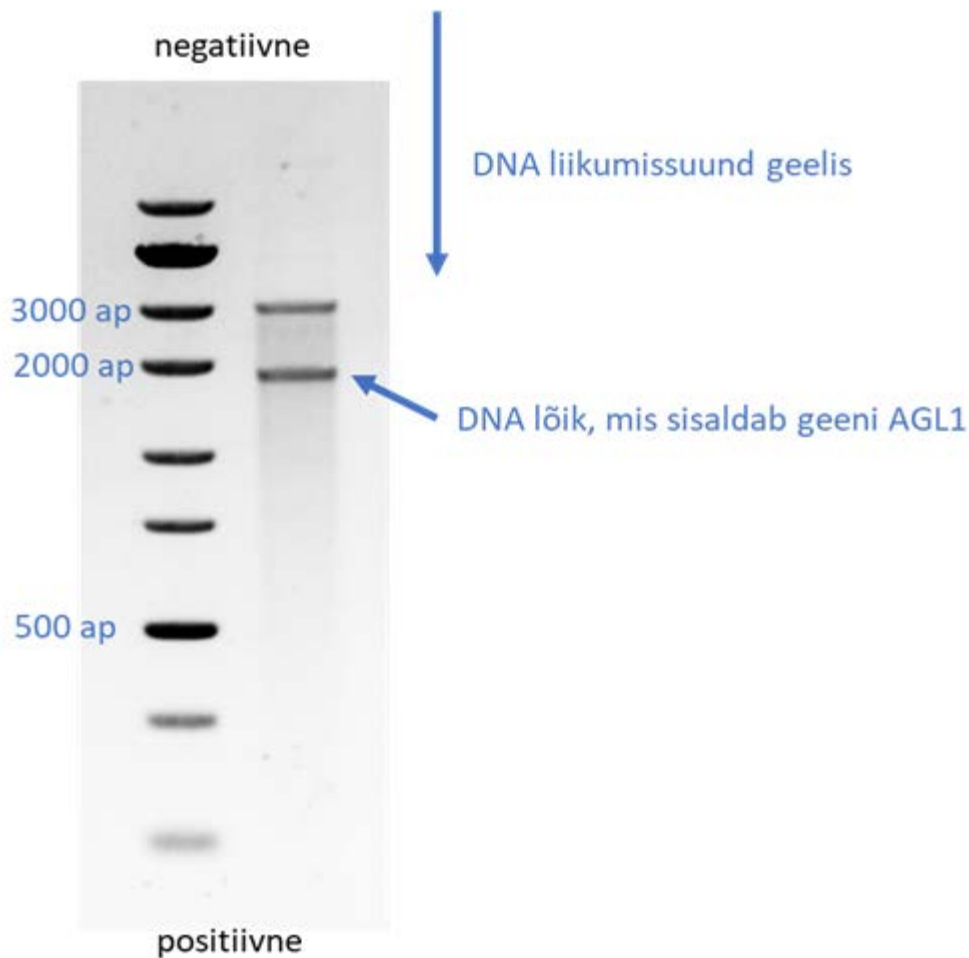
Teise lõigu pikkuse arvutamiseks peab lahutama plasmidi kogupikkusest esimese lõigu pikkus

4780-2949=1831

Restriksiooni tulemusena saadakse 2949 bp ja 1831 bp pikad DNA lõigud

1.2. Kleebi siia saadud geelipilt. Geelipildil on tähistatud positiivse ja negatiivse elektroodi asukohad ning võrdluseks on DNA marker, mis koosneb DNA lõikudest pikkustega 10000, 5000, 3000, 2000, 1200, 850, 500, 300 ja 100 aluspaari. Märki geelipildi kõrvale DNA liikumise suund geelis! Kirjuta geelipildi juurde, millisele triibule vastavad DNA markeri lõigud pikkusega 3000, 2000 ja 500 aluspaari! Näita noolega, kummale triibule vastab DNA lõik, mis sisaldab AGL1 geeni!

(9p)



Restriksiooni õnnestumine - 7

Õigesti märgitud DNA suund - 0.5

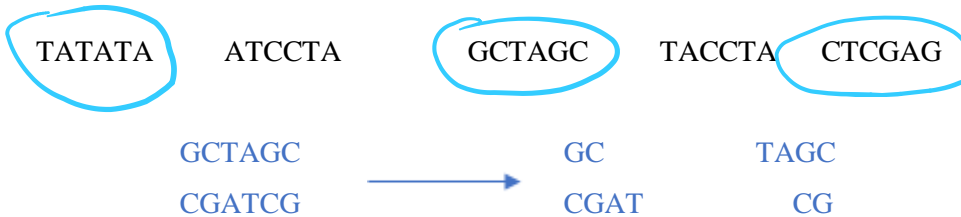
Õigesti valitud geeni sisaldav lõik - 1

Õigesti märgitud markeri lõigud - 0.5

1.3. Miks ei ole alati võimalik sama plasmidi kasutada geeni ekspresseerimiseks ja valgu tootmiseks nii bakteris kui ka pärmis? Too välja vähemalt 2 põhjust! (2p)

Plasmid peab valgu tootmiseks kasutatavas organismis replitseeruma ning peab toimuma meid huvitava geeni transkriptsioon. Bakteriaalne replikatsiooni alguspunkt ja promootorala on erinevad pärmiraku omast ja pärmirakus neid ei tunta ära. Lisaks on erinevad ka sobivad selektsiooni markergeenid. Transformeerunud bakterite selektsioonil kasutatakse kõige sagedamini antibiootikumi resistentsusgene, pärmide puhul aga auksotroofseid markergeene.

1.4. Restriktaasid tunnevad ära DNA palindroomseid järjestusi. Otsusta, millised järgmistest järjestustest võivad olla restriktaaside äratundmisjärjestuseks (tõmba neile ring ümber)! Vali üks neist ja näita (kirjuta/joonista) milline on restriksiooni tulemus, kui restriktaas katkestab DNA kaksikahela äratundmisjärjestuse teise ja kolmanda nukleotiidi vahel! (Joonista välja mõlemad ahelad) (2p)



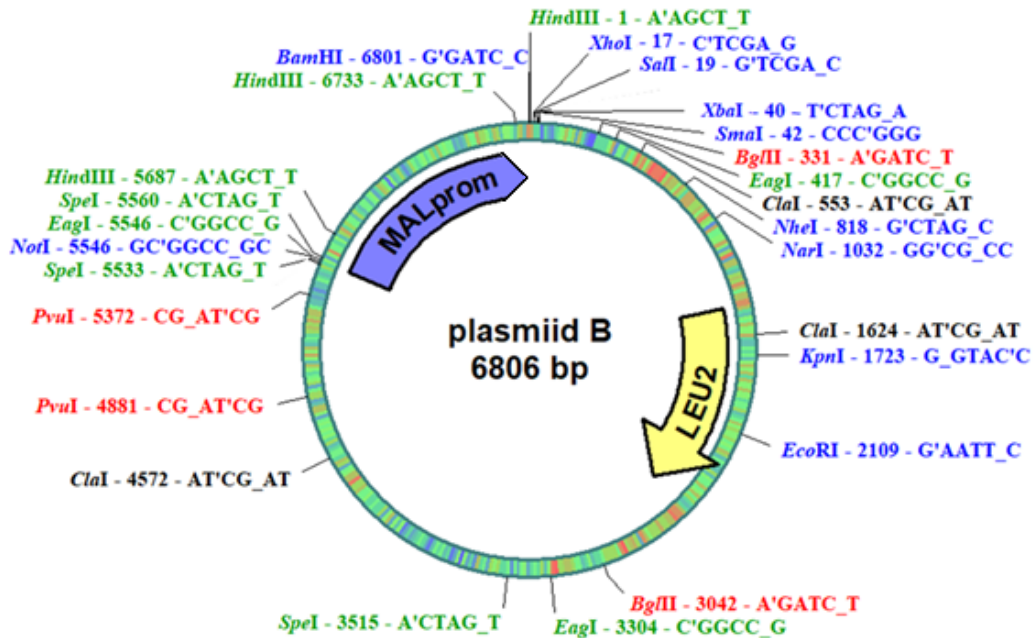
1.5. Restriktaaside tekitatud katke tulemusena tekkivad otsad võivad olla kas üheaheelalise üleulatuva lõiguga (nõ “kleepuvad”) või tõmbid. Nimeta üks restriktaas, mille lõikamise tulemusena tekivad kleepuvad otsad ja üks, mille lõikamise tulemusena tekivad tõmbid DNA otsad! (1p)

Plasmiidikaartidel on toodud restriktaaside äratundmisjärjestused ja näidatud koht, kust restriktaas lõikab. Selle järgi saab tuletada, kas restriksiooni tulemusena tekkinud otsad on kleepuvad või tõmbid.

Tõmbid otsad tekivad järgmiste restriktaaside töö tulemusena: DraI, ScaI ja SmaI. Ülejäänud joonisel 1 ja 2 toodud restriktaasid tekitavad kleepuvaid otsi.

1.6. Allpool on plasmidi B kaart. Selleks, et sisestada plasmiidist A välja lõigatud AGL1 geeni sisaldav DNA lõik plasmidi B, pead plasmidi B kõigepealt katki lõikama. Millist/milliseid restriktaase kasutad, et lõigata katki plasmiid B? (1p)

XbaI ja XhoI, kuna oled samade restriktaasidega lõiganud plasmiidist A välja DNA lõigu, mis sisaldab geeni AGL1. Selleks, et ühendada kaks DNA lõiku omavahel, peavad nende otsad olema omavahel komplementaarsed. (või mõlemad lõigatud restriktaasidega, mis tekitavad tõmbid DNA otsad)

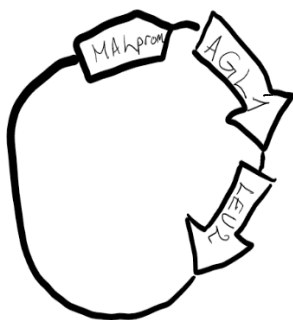


Joonis 2. Plasmidi B kaart

1.7. Seejärel tuleb plasmidist A välja lõigatud AGL1 geeni sisaldav DNA lõik agarosgeelist välja puhastada ning sisestada plasmidi B. Millist ensüümi pead sa lisama reaktsioonisegusse, mis sisaldab katkilõigatud plasmidi B ja DNA lõiku geeniga AGL1, et konstrueerida plasmid, mis sisaldab geeni AGL1? (0.5p)

Ligaasi

1.8. Joonista kloneerimise tulemusena saadav plasmid skemaatiliselt (restriktaaside lõikesaite ära peale märgi!)! (2p)



1.9. Kui pikk on tulemuseks saadud plasmid? (1.5p)

Plasmiidi B lõikamisel restriktasididega XbaI ja XhoI lõigatakse välja lühike DNA jupp. Selle jupi pikkus on

$40-17=23$ aluspaari

Katkilõigatud plasmiidi B pikkus on seega

$6806-23=6783$ aluspaari

Ligeerides kokku katkilõigatud plasmiid B ja geeni AGL1 sisaldav DNA lõik, on saadud plasmiidi pikkuseks

$6783+1831=8614$ aluspaari

1.10. Millega on põhjendatud Katrini lootus, et pagaripärmis toodetud *Scheffersomyces stipitis*'e α -glükosidaas saavutab õige tertsiarse struktuuri ning on seega aktiivne ensüüm? Too välja kaks põhjust! (2p)

Tertsiarse valgustruktuuri saavutamisele aitavad kaasa tšaperonid. Prokarüootide ja eukarüootide tšaperonid on erinevad, seetõttu ei pruugi pärmi ensüüm ei saavutada bakterirakus õiget struktuuri. Kuna nii *S. stipitis*, millest meid huvitab ensüüm on pärit, kui ka *S. cerevisiae*, milles saame valku nüüd ekspresseerida, on eukarüootid ja ka evolutsiooniliselt lähedased organismid, on neil sarnased tšaperonid, mistõttu on lootust, et valk saavutab oma õige tertsiarse struktuuri.

Samuti võib pärmivalk bakteris ekspresseerudes valesti voltuda seetõttu, et bakterirakus ei viida korrektselt läbi antud valgule vajalikke post-translatsioonilisi modifikatsioone, näiteks nagu disulfiidsildade teke ja valgu glükosüleerimine

2. Reportergeeni ülesanne

Molekulaarbioloogias kasutatakse geeni promootori aktiivsuse mõõtmiseks reportergeene. Reportergeenilt toodetud valgu aktiivsuse kaudu saab teha järeldusi uuritava geeni avaldumise kohta. Promootor on nukleotiidne järjestus, kuhu seondub RNA polümeraas ning sealt algab geeni transkriptsioon.

Reportergeen peab olema kergesti kvantitatiivselt mõõdetav, et meil oleks võimalik selle põhjal transkriptsiooni hinnata. Antud töös kasutame me selleks merebakteri *Vibrio harvey* lutsiferaasi tootvat geeni *lux*. Lutsiferaasi reaktsiooni käigus eraldub valgus ja seda valguse eraldumist on võimalik mõõta. Sarnasel põhimõttel toodavad bioluminestsentsi ka jaanimardikad.

Antud katses on *lux* geeni ette kloonitud huvipakkuva geeni “Geen X” promootor. Mõlemad katses mõõdetavad bakterikultuurid on kasvanud rikkas söötmes 3 tundi (s.t kasv tingimustes, kus toitaineid on ülehulgas ning kasvu limiteerivaid faktoreid ei ole). Kahe tunni möödumisel on bakterikultuuri B kiiritatud UV kiirgusega, bakterikultuuri A ei ole kiiritatud.

2.1. Mis kahjustusi põhjustab UV kiirgus bakterirakkudes? Vali õige vastus ja tõmba sellele ring ümber. (1p)

- Peatab elektron-transport ahela
- Muudab membraanipotentsiaali
- Peatab valgusünteesi
- Tekitab kovalentseid ristsidemeid kõrvuti paiknevate pürimidiinide vahel
- Põhjustab fosfodietersidemete teket nukleotiidide vahel
- Suurendab posttranslatsiooniliste modifikatsioonide hulka

2.2. Bioluminestsentsi tootmine on energiakulukas protsess. Kust tuleb energia reaktsiooni läbiviimiseks? (1p)

Raku enda elutegevusest, söötmest...

Töövahendid:

- 2 katseklaasi rakukultuuriga (märgistatud A ja B)
- Valguse mõõtmise tuub (2 tk)
- Na-fosfaat puhver pH 7 (algkontsentratsioon 100 mM)
- Lutsiferaasi ensüümi substraat – dekanaal (algkontsentratsioon 5 mM) (assistendi käes)
- Parafilmi tükid reaktsioonisegu segamiseks

- Bakterikultuuri lahjendamiseks LB-söödet
- Plastiküvetid bakterikultuuri tiheduse mõõtmiseks (2 tk)

Töö käik:

Valguse eraldumise mõõtmiseks tuleb kokku segada reaktsioonisegud, kummagi uuritava rakukultuuri jaoks eraldi. Reaktsioonisegu lõppmaht on 1 ml ning see peab sisaldama:

- dekanaali lõppkontsentratsiooniga 50 μM ;
- 100 μl bakterikultuuri;
- Na-fosfaat puhvrit

2.3. Arvuta, mitu mikrolitrit dekanaali ja Na-fosfaat puhvrit pead reaktsioonisegusse lisama. (2p)

5 mM = 5000 μM ; 5000/50=100 x; 1000/100=10 μl dekanaali

1000-100-10=890 μl Na-fosfaat puhvrit

Reaktsioonisegusse kulub μl dekanaali ja μl Na-fosfaat puhvrit.

Kutsu assistent oma vastust kontrollima, temalt saad vajadusel õige vastuse, allkirja ning dekanaali lahuse.

Assistendi allkiri.....

Sega valguse mõõtmise torus kokku reaktsioonisegud (pärast komponentide lisamist kata toru ots parafilmi tükiga ning loksuta) ja lase reaktsioonil toimuda toatemperatuuril vähemalt 5 minutit, aga mitte üle 20 minuti. Jälgi aega stopperiga. Valguse eraldumist mõõdetakse luminomeetriga. Selleks aseta valguse mõõtmise tuub masinasse, sulge kaas ja vajuta nuppu „Go”. Enne tuubide masinasse asetamist sega neid korra veel. Kindlasti mõõda enda reaktsioonisegud järjest, et reaktsiooniaeg oleks võrreldav.

Lutsiferaasi aktiivsus esitatakse rakupopulatsiooni kohta suhtelise valguse ühikutes (RLU – relative light unit). Seega pead mõõtma ka bakterikultuuride optilise tiheduse. Rakupopulatsiooni tihedus algse kultuuris on liiga suur, et seda otse mõõta, mistõttu tuleb algsest rakukultuurist teha plastikküveti 5x lahjendus, kasutades LB-söödet. Optilise tiheduse mõõtmiseks peab plastikküvetis olema kokku 1 ml vedelikku. Rakukultuuri tihedus tuleb mõõta spektrofotomeetriga lainepikkusel 580 nm.

Bakterikultuuri tiheduse mõõtmiseks aseta lahjendatud bakterikultuuriga küvett spektrofotomeetri ülemisse pesasse nii, et valguskiir, mis liigub vasakult paremale tabaks küveti kolmnurgaga tähistatud külge, milles on kitsas läbipaistev aken. Näidu lugemiseks sulge aparraadi kaas, vajuta rohelist nuppu ning märgi tulemus harjutuse 2.5 juures olevasse tabelisse. Kalla mõõdetud proov kraanikaussi, loputa küveti destilleeritud veega ning aseta kuivama.

2.4. Arvuta, mitu mikrolitrit bakterikultuuri ja mitu mikrolitrit LB-söödet pead plastikküvetti pipeteerima. (1p)

1000/5=200 µl bakterikultuuri; 1000-200=800 µl söödet

Plastikküvetti pipeteerin µl rakukultuuri ja µl LB-söödet.

2.5. Vastavalt luminomeetri ja spektrofotomeetri näitudele ning antud valemit kasutades täida järgnev tabel (10p):

$$RLU = \frac{\text{Luminomeetri näit}}{\text{Rakukultuuri tihedus}}$$

(3p + 3p normaalsete luminomeetri näitude eest; 1p +1p kui kultuuri optilised tihedused on normaalses vahemikus; 2p kui RLU arvutus on korrektselt tehtud ehk, et rakukultuuri on spektrofotomeetris mõõtmiseks 5x lahjendatud, aga arvutuses tuleb kasutada algset rakukultuuri tihedust)

	Luminomeetri näit	Spektrofotomeetri näit (λ580)	Lutsiferaasi suhteline aktiivsus (RLU)
Rakukultuur A			
Rakukultuur B			

Järgnevatele kahele küsimusele vastamisel lähtu enda tulemustest.

2.6. Mis võib tõsta „Geen X“ avaldumise taset bakteris? (0,5 p)

UV, stress, DNA kahjustused

2.7. Mis võiks olla „Geeni X“ roll rakkudes? (1 p)

Stressivastus, UV-kahjustuste parandamine

2.8. Otsusta millised väited on tõesed. Tõesed tähistatakse +, väärad 0 (2,5 p)

Reportergeeni kasutades saame teha järgmist:

- a. Uuritava geeni replikatsiooni taseme kohta
- b. Uuritava geeni transkriptsiooni taseme kohta
- c. Reportergeeni avaldumise tingimuste kohta
- d. Uuritava geeni aktiivsuse kohta
- e. Uuritava geeni avaldumise tingimuste kohta

0
+
0
0
+